

## 別紙 4

## 学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 白色脂肪組織特異的 amphiregulin 過剰発現マウスの作製、  
および形質の解析

広島大学大学院生物圏科学研究科  
生物機能開発学 専攻  
学生番号 D144335  
氏 名 楊 波

## 研究背景、および目的

生活習慣の欧米化に伴うカロリーの過剰摂取によって、皮下および内臓周囲の白色脂肪組織重量は増大し、肥満病態が引き起こされる。特に、内臓脂肪性肥満はメタボリックシンドローム発症の基礎疾患であり、高血圧や高血糖、脂質代謝異常が組み合わさることにより冠動脈や脳血管の動脈硬化を招くなど極めて重要な社会問題となる。白色脂肪細胞は、カロリー摂取量の増加に基づく余剰エネルギーを中性脂肪の形態で蓄積し、蓄積された中性脂肪は必要に応じて分解されることで、エネルギー供給において重要な役割を果たす。その肥満発症に伴う白色脂肪組織の増大には、脂肪組織の大部分を構成する白色脂肪細胞自身の細胞サイズの増大（肥大化）のみならず、脂肪細胞数の増加が誘導されると考えられている。白色脂肪細胞の増殖に関する知見は得られつつあるが、肥満発症時の白色脂肪細胞の数の制御、特に、肥満白色脂肪組織における脂肪細胞数の増加の分子メカニズムは未解明のままである。一方、脂肪細胞はアディポサイトカインと呼ばれる多様な生理活性物質の分泌を通して全身性の代謝調節を担っており、また、肥満発症に伴う白色脂肪組織でのアディポサイトカインの分泌異常が生活習慣病のみならず、発癌への関与も示唆されている。しかしながら、アディポサイトカインの産生機構や生理作用の分子メカニズムなどについて未解明な部分が多く、さらに、未同定のアディポサイトカインの存在も示唆されている。

本研究では、当研究室において以前に実施された DNA microarray 法を用いた遺伝性肥満モデル (*db/db*) マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現の網羅的な解析結果を参照することで、肥満発症や病態の進行に伴って発現上昇する遺伝子群から細胞増殖に関与する候補因子として amphiregulin (以下、AREG) を単離し、さらに、白色脂肪組織における特異的に AREG を過剰発現するトランスジェニックマウス (AREG Tg マウス) の樹立を行った。肥満白色脂肪組織の形成機構における高発現させた AREG の生理的意義の解明、および AREG 遺伝子を有する遺伝性肥満 *db/db* マウスを新たに作出することで、遺伝性肥満モデルマウスの肥満発症における AREG の病態的な役割の解明を目指した。

## 実験方法、および結果

### 第一章 肥満白色脂肪組織において発現増加する AREG の単離

#### 1. 肥満発症モデルマウスの白色脂肪組織における AREG の発現解析

当研究室において DNA microarray 法により *db/db* マウスの白色脂肪組織において発現変動する遺伝子の解析結果から、AREG、FGF13、および FGF21 を単離した。遺伝性肥満 *db/db* マウスと正常である *db/+* マウス、および高脂肪食負荷 (HFD) マウスと正常食を負荷したマウスの精巣周囲白色脂肪組織における AREG の発現を解析したところ、*db/db* マウスの精巣周囲白色脂肪組織において、AREG mRNA の発現量は 80 倍上昇し、HFD マウスにおいて AREG mRNA の発現量は 10 倍上昇した。

#### 2. 肥満発症の白色脂肪組織における AREG とマクロファージ細胞との関連性の解析

高脂肪食負荷 1、3、5、9 週間後のマウスの精巣周囲白色脂肪組織において AREG、およびマクロファージ細胞マーカーである *Emr1* やマクロファージ細胞の遊走、および浸潤に関与するケモカインである CCL2/Mcp-1 の発現解析を行った。その結果、AREG 発現量と *Emr-1* および *Mcp-1* の発現は正に相関していることが明らかとなった。また、マウス的大腿骨から骨髓単核球を回収し、M-CSF 培地で培養した後、LPS および IFN- $\gamma$  を用いて M1 様マクロファージ細胞を誘導した際に、AREG mRNA の発現誘導が認められた。

### 第二章 白色脂肪組織における AREG 過剰発現マウスの作製、および形質の解析

#### 1. 白色脂肪組織における AREG 過剰発現マウスの作製、および形質の解析

白色脂肪組織特異的に発現を誘導する *aP2* 遺伝子 promoter 領域とマウス由来 AREG 遺伝子を連結させたキメラコンストラクトを作製し、マウス受精卵に対してマイクロインジェクションを行い、AREG Tg マウスを作製した。キメラ遺伝子の導入を確認したマウスの白色脂肪組織において AREG mRNA の発現量の増加、および血清中の AREG タンパク質濃度の著しい上昇を確認した。さらに、AREG Tg マウスにおいて白色脂肪組織の重量が有意に減少しており、摘出した精巣周囲白色脂肪組織のパラフィン切片を用いて H&E 染色を行った結果、脂肪細胞面積の縮小が認められた。また、白色脂肪組織において遺伝子の発現変動について解析したところ、TNF- $\alpha$  mRNA および PGC1- $\alpha$  mRNA が有意に増加し、leptin mRNA は有意に減少した。

#### 2. AREG 遺伝子を高発現させた遺伝性肥満 *db/db* マウスの作製、および形質の解析

遺伝性肥満モデルマウスの肥満発症における AREG の病態的な役割の解明を行うため、雌性 *db/+* マウスと雄性 AREG Tg マウスを交配させ、*aP2-AREG* 遺伝子を有する *db/+* マウスを得た後、*db/+* マウスを再度交配させ、*aP2-AREG* 遺伝子を有する遺伝性肥満 (AREG-*db/db*) マウスを新たに作出した。AREG-*db/db* マウス形質を解析したところ、AREG-*db/db* マウスの体重や白色脂肪組織重量が有意に減少した。さらに、白色脂肪組織切片を用いて H&E 染色した結果、白色脂肪細胞面積の縮小が認められた。

#### 3. AREG Tg マウスを用いた DSS 誘導性大腸炎モデルマウスの作製、および形質の解析

白色脂肪組織において分泌された AREG が白色脂肪組織以外の組織の生理機能に与える影響を考え、DSS 大腸炎の発症に及ぼす影響を検討した。1.5%を含有したデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の飲水によって AREG Tg マウスの大腸炎を誘導した結果、大腸炎発症 7 日において、AREG Tg マウスはコントロールマウスと比較して、大腸炎の指標としての血便や肛門周囲の観察に基づく DAI score や体重において有意な差は認められなかった。しかしながら、DSS 投与から水道水に戻した大腸炎からの回復期において AREG Tg マウスの体重の有意な減少が認められた。さらに、AREG Tg マウスにおいて精巣周囲や腎臓周囲白色脂肪組織重量に有意な減少が認められた。一方、大腸長さや大腸組織における TNF- $\alpha$  や IL-6 の発現量に有意な差は認め

られなかったことから、大腸の炎症状態に差は認められず、体重減少は白色脂肪組織重量の減少に基づくと考えられる。

## 考察

本研究において、肥満発症に伴って白色脂肪組織において著しく発現上昇する AREG を単離し、肥満形成のプロセスにおいて、AREG の生理的役割に関する解析を行った。肥満発症に伴ってマクロファージ細胞マーカーである *Emr1* の発現量と AREG mRNA 発現量には正の相関が認められ、M1 様マクロファージ細胞における AREG の発現が認められたことから、肥満白色脂肪組織における AREG の発現上昇には白色脂肪組織内に浸潤する M1 様マクロファージ細胞が関与し、慢性炎症を反映していること可能性が示唆された。以上の結果は、AREG は白色脂肪組織の慢性炎症に関与するマクロファージ細胞など炎症性細胞の遊走や活性化に関わる可能性やマクロファージ細胞と白色脂肪組織の crosstalk に関与する可能性が示唆された。*aP2* 遺伝子プロモーターを用いて白色脂肪組織において AREG を高発現する AREG Tg マウスの樹立し、形質の解析を行ったところ、予想に反して白色脂肪組織重量が有意に減少することが示された。その際に、白色脂肪細胞のサイズの縮小は認められたが、脂肪細胞数の増加については確認されなかったことから、AREG は肥満発症の際に脂肪細胞の肥大化を抑制する負の制御因子である可能性が示唆された。さらに、精巣周囲白色脂肪組織において、炎症性因子 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) や PPAR $\gamma$  コアクチベーターである PGC1- $\alpha$  の発現量が有意に増加していたことから、脂肪細胞での中性脂肪の分解やエネルギー消費が促進している可能性が考えられた。本実験結果は、AREG 遺伝子を有する遺伝性肥満 *db/db* マウスにおいても白色脂肪組織重量が有意に減少したことから、AREG が白色脂肪組織の形成を負に制御する可能性が強く示唆された。一方、AREG Tg マウスでは血中 AREG 濃度の増加が認められたことから、大腸組織など他組織の生理機能に影響を与えることを考慮し、DSS 誘導性大腸炎モデルにおける評価を行った。血中 AREG 濃度の増加は大腸炎の発症に対して影響は与えなかったが、水道水の飲水投与による回復期において体重増加が有意に抑制され、白色脂肪組織重量のみが有意に減少した。以上の実験結果から、AREG は病態からの回復期における体重増加、および白色脂肪組織重量の増加を抑制すると考えられた。一方、AREG は EGF ファミリーのの一つとして様々な細胞増殖、および細胞分化に関与し、主に上皮系細胞である乳癌細胞や肺癌細胞に対する増殖因子として強力な生理作用を有することが報告されている。特に、AREG は肺癌発症において重要な病態的役割が示唆されており、本研究は AREG が新規のアディポサイトカインとして、他組織の生理機能に対して影響を与えるのみならず、発癌への関与について今後の更なる検証が必要である。